

Susceptibilidad a fluoroquinolonas de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus spp* aisladas de gatos domésticos.

Albarellos, G.A.¹; Denamiel, G.A.²; Gentilini, E.R.²; Landoni, M.F.³

1. Cátedra de Farmacología.
albarell@fvvet.uba.ar

2. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Av. Chorroarín 280 - C1427 Ciudad Autónoma de Bs. As., Argentina.

3. Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Calle 60 y 118. CC 296B1900 Ciudad de La Plata, Argentina.

CONICET

Palabras clave: Ciprofloxacina, levofloxacina, marbofloxacina, CIM, CBM.

Keywords: Ciprofloxacin, marbofloxacin, levofloxacin, MIC, MBC.

RESUMEN

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos muy utilizados para el tratamiento de infecciones en animales domésticos. Su espectro de acción incluye microorganismos gramnegativos, enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, y grampositivos como estafilococos. La aparición de resistencia bacteriana es un fenómeno que se produce con relativa frecuencia. En este trabajo se propuso caracterizar la susceptibilidad *in vitro* (evaluada a través de la concentración inhibitoria y bactericida mínima (CIM y CBM)) de ciprofloxacina, marbofloxacina y levofloxacina frente a aislamientos de *Escherichia coli* y de *Staphylococcus spp.* obtenidos a partir de infecciones de gatos domésticos. Las CIM50 de ciprofloxacina, marbofloxacina y levofloxacina fueron respectivamente: 0,015 µg/ml, 0,031 µg/ml y 0,031 µg/ml sobre *E. coli*; 0,25 µg/ml, 0,25 µg/ml y 0,125 µg/ml frente a estafilococos coagulasa positivo; y 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml y 0,125 µg/ml frente a estafilococos coagulasa negativo. Las CBM50 de las tres fluoroquinolonas estudiadas fueron: 0,0625 µg/ml frente a *E. coli*; 0,5 µg/ml sobre estafilococos coagulasa positivo; y de 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml y 0,125 µg/ml frente a estafilococos coagulasa negativo para ciprofloxacina, marbofloxacina y levofloxacina, respectivamente. La CIM90 y CBM90 de las tres fluoroquinolonas frente a *E. coli* y estafilococos coagulasa positivo fue ≥ 8 µg/ml, mientras que para los estafilococos coagulasa negativo los valores de CIM90 fueron 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml y 0,125 µg/ml respectivamente y la CBM90 de 0,5 µg/ml, 1 µg/ml y 1 µg/ml.

SUMMARY

Susceptibility to fluoroquinolones of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* strains isolated from domestic cats.

Fluoroquinolones are antimicrobials widely used in domestic animals infections. Their spectrum includes gramnegative (enterobacteria and *Pseudomonas aeruginosa*) and grampositive microorganisms (*Staphylococcus spp.*). Bacterial resistance to fluoroquinolones is expressed with relative frequency. The aim of the present study was to characterize *in vitro* susceptibility, through the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC) of ciprofloxacin, marbofloxacin and levofloxacin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus* strains isolated from domestic cat infections. Ciprofloxacin, marbofloxacin and levofloxacin MIC50 values were respectively: 0,015, 0,031 and 0,031 µg/ml on *Escherichia coli*; 0,25, 0,25 and 0,125 µg/ml on coagulase positive staphylococci; and, 0,125, 0,25 and 0,125 µg/ml on coagulase negative staphylococci. The three fluoroquinolones have the same MBC50 value for *Escherichia coli* (0,0625 µg/ml) and coagulase positive staphylococci (0,5 µg/ml); and 0,125, 0,25 and 0,125 µg/ml on coagulase negative staphylococci for ciprofloxacin, marbofloxacin and levofloxacin, respectively. The MIC90 and MBC90 for the three fluoroquinolones on *Escherichia coli* and coagulase positive staphylococci was ≥ 8 µg/ml, and on coagulase positive staphylococci 0,125, 0,25 and 0,125 µg/ml; and, 0,5, 1 y 1 µg/ml for ciprofloxacin, marbofloxacin and levofloxacin, respectively.

Introducción

Las fluoroquinolonas (FQs) son antimicrobianos muy utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas en medicina humana y veterinaria. Son drogas bactericidas que inhiben la función de las topoisomerasas (ADN girasa y topoisomerasa IV). Las FQs incluyen en su espectro de acción a bacterias gramnegativas y grampositivas siendo las enterobacterias especialmente sensibles. Otros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus spp.* poseen una

menor sensibilidad, por lo que requieren dosis mayores¹⁹.

Ciprofloxacina es una de las primeras FQs sintetizadas y es utilizada como droga patrón para comparar la potencia antibacteriana relativa de los demás miembros del grupo. En la actualidad esta FQ se ha incorporado a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de infecciones en animales de compañía.

Las FQs más modernas (ej. gatifloxacina, moxifloxacina, clinafloxacina, sitafloxacina) aventajan a ciprofloxacina por tener mayor espectro de acción particularmente

frente otras bacterias grampositivas como *Streptococcus spp.* e incluso frente microorganismos anaerobios¹⁹. Por el momento, el alto costo económico de estos compuestos hace que no sean utilizados para el tratamiento de infecciones en animales.

Entre las drogas sintetizadas para uso veterinario exclusivamente encontramos a enrofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina y, más recientemente, pradofloxacina. El espectro antimicrobiano de estos compuestos es similar al de las FQs de primera generación, sin embargo, el mejor

perfil farmacocinético (mayor absorción oral y más amplia distribución en los tejidos) las diferencia significativamente⁴.

La relativa facilidad con que las FQs seleccionan bacterias resistentes hace imprescindible la implementación de pruebas de susceptibilidad (antibiograma por difusión) antes de decidir su uso en cada caso en particular. El conocimiento de los perfiles de susceptibilidad a través de pruebas cuantitativas, como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM), es de gran importancia para orientar las decisiones terapéuticas y además como herramienta para el monitoreo epidemiológico en estudios sobre la evolución de la resistencia a FQs.

A través de la medición de la CIM se puede estimar la potencia antibacteriana, aunque es de resaltar que para el caso de las FQs esta valoración por pruebas de susceptibilidad in vitro suele no ser suficiente para garantizar el éxito de un tratamiento. Para estas drogas es muy importante la aplicación de los indicadores de eficacia terapéutica que combinan la susceptibilidad in vitro con el comportamiento farmacocinético in vivo (a través de parámetros farmacocinéticos, como el área bajo la curva [ABC]). En el caso de las FQs los valores óptimos de los indicadores de eficacia terapéutica son: una relación $C_{max} / CIM > 10$ y una relación $ABC (0-24) / CIM > 125$ ^{14,18}.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad y potencia antimicrobiana de ciprofloxacina, levofloxacina y marbofloxacina frente a aislamientos de *Escherichia coli* y *estafilococos spp.* obtenidos de infecciones de ocurrencia natural en gatos domésticos.

Materiales y métodos

Fluoroquinolonas ensayadas:

Ciprofloxacina (CIP): droga pura (potencia: 98.6%) (Bagó, La Plata, Argentina).

Levofloxacina (LVX): droga pura (potencia: 97.2%) (Janssen-Cilag, Buenos Aires, Argentina).

Marbofloxacina (MBX): droga pura (potencia: 100%) (Vétoquinol, Lure, Francia).

Aislamientos bacterianos:

Se trabajó con un total de 53 muestras provenientes de infecciones (abscesos, piodermias, conjuntivitis, otitis, orina, piómetra y secreciones genitales y vías aéreas superiores) en gatos domésticos que no presentaban registro de haber sido tratados con antibióticos en los 10 días previos a la toma de las muestras. Algunos de esos animales (17/53) tenían antecedentes de tratamientos previos con alguna FQ (enrofloxacina, ciprofloxacina o norfloxacina). Las muestras fueron obtenidas entre los años 2006-2008 de gatos que viven en la ciudad de Buenos Aires, Gran Buenos Aires y zonas de influencia.

Las bacterias fueron cultivadas, aisladas e identificadas según procedimientos estándares¹³. Los estafilococos se identificaron utilizando técnicas de Gram, catalasa y pruebas de óxido-fermentación de la glucosa y coagulasa (plasma de conejo citratado).

Para la identificación de las *E. coli* se utilizó la técnica de Gram y las pruebas de oxidasa, catalasa, oxidofementación de la glucosa, producción de ácido y gas de lactosa, sacarosa y manitol, así como determinación de indol, rojo de metilo, Vogues Proskauer, citrato de sodio y urea.

Pruebas de susceptibilidad bacteriana

CIM y CBM.

Para el ensayo de la CIM se eligió la técnica de macrodilución en caldo por ser ésta una prueba cuantitativa que permite la posterior estimación de la CBM.

El método empleado en la técnica de CIM se realizó según las recomendaciones del CLSI⁷. Este método consiste en enfrentar diluciones crecientes del antimicrobiano con una cantidad fija de microorganismos (5 x 10⁵ UFC/ml) y, luego de una incubación a 37°C por 18 h, el tubo con la dilución sin crecimiento visible será el correspondiente a la CIM.

Para la técnica de CBM se siguieron los protocolos recomendados por Amsterdam 5. Básicamente la técnica consiste en sembrar todos los tubos sin crecimiento visible (de la prueba de CIM) y, luego de una incubación a 37°C por 24 h, el tubo que muestra una inhibición del 99,9% de los microorganismos sembrados

será la dilución del antimicrobiano correspondiente a la CBM.

Las FQs estudiadas se diluyeron en caldo Mueller-Hinton en forma seriada al doble en un rango que incluyera los valores esperados de sensibilidad de los microorganismos probados (4 - 0.0019 µg/ml)^{7,18,19}.

Se consideró sensibles a los microorganismos con CIM ≤1 µg/ml, de sensibilidad intermedia con CIM 2 µg/ml y resistentes con CIM ≥4 µg/ml^{6,7}.

Para los microorganismos cuyo crecimiento no se vio afectado en ninguna de las diluciones probadas se consideró un valor de CIM ≥8 µg/ml.

Para describir estadísticamente los valores de CIM y de CBM hallados se utilizaron los siguientes parámetros:

_Rango: valores máximo y mínimo de CIM y de CBM hallados para cada bacteria.

_CIM50: valor de CIM que acumula el 50% de las cepas estudiadas.

_CIM90: valor de CIM que acumula el 90% de las cepas estudiadas.

_CBM50: valor de CBM que acumula el 50% de las cepas estudiadas.

_CBM90: valor de CBM que acumula el 90% de las cepas estudiadas.

_Cepas control: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Resultados

Del total de 53 muestras se aislaron 30 estafilococos (10 coagulasa positivo (ECP) y 20 coagulasa negativo (ECN)) y 23 cepas de *Escherichia coli*. Ver Tabla 2.

El resumen de los valores obtenidos para la CIM y la CBM de las tres fluoroquinolonas estudiadas para *Escherichia coli* y para los *Staphylococcus spp.* se muestran en la Tabla 2.

La proporción de cepas resistentes halladas para las tres FQs fue de 9/23 entre las *E. coli*, 2/10 entre los ECP y de 0/20 entre los ECN. La proporción de cepas con sensibilidad intermedia fue de 2/23 para *E. coli*, 2/10 para ECP y de 1/20 para ECN.

La potencia comparativa de las tres FQs estudiadas (expresada a través de la CIM50), fue la siguiente:

_Para *E. coli*: CIP > MBX = LVX,
_Para ECP: LVX > CIP = MBX, y
_Para ECN: CIP = LVX > MBX.

Tabla 1.
Procedencia de las muestras bacterianas.

Procedencia	E. coli	ECP	ECN
Abscesos	---	2	9
Piodermia	---	3	---
Ojo/Vías aéreas superiores	6	2	3
Otitis	---	---	1
Orina	12	1	1
Piódmetra y secreciones genitales	2	---	5
Origen no establecido	3	2	1
Total de muestras	23	10	20

Tabla 2.
Valores de CIM y CBM de ciprofloxacina (CIP), marbofloxacina (MBX) y levofloxacina (LVX) para las cepas de E. coli y Staphylococcus spp. (ECP y ECN) aisladas de gatos domésticos.

Parámetro	<i>Escherichia coli</i> (n=23)			ECP (n=10)			ECN (n=20)			
	CIP	MBX	LVX	CIP	MBX	LVX	CIP	MBX	LVX	
CIM (µg/ml)	Rango	0,0039- ≥8	0,0078- ≥8	0,0078- ≥8	0,0625- ≥8	0,125- ≥8	0,0625- ≥8	0,0625- 0,5	0,125- 2	0,0625- 1
	CIM ₅₀	0,015	0,031	0,031	0,25	0,25	0,125	0,125	0,25	0,125
	CIM ₉₀	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	0,125	0,25	0,25
CBM (µg/ml)	Rango	0,0078- ≥8	0,015-≥8	0,015-≥8	0,125-≥8	0,25-≥8	0,125-≥8	0,0625-2	0,25-2	0,125-1
	CBM ₅₀	0,00625	0,0625	0,0625	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25
	CBM ₉₀	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8	0,5	1	1

Discusión y conclusiones

Los microorganismos incluidos en este estudio (*E. coli* y estafilococos) para realizar las pruebas de CIM y CBM de las FQs estudiadas, fueron seleccionados en función de dos criterios: ser aislados con elevada frecuencia a partir de estos focos infecciosos (Tabla 1) y, estar incluidos dentro del espectro antibacteriano de las FQs.

Los valores de CIM90 obtenidos arrojaron información similar a los reportados en la bibliografía mundial para aislamientos bacterianos de origen animal^{6,11,12,15-17,20}. De acuerdo a lo esperado para antimicrobianos bactericidas, los valores de CBM90 fueron coincidentes con los obtenidos para la CIM90; o bien, se encontraron en las siguientes concentraciones probadas^{8,16}.

Al igual como sucede en otros estudios^{6,11,15-17,20} los valores de CIM50 obtenidos para CIP, MBX y LVX en todos los microorganismos ensayados se encuentran dentro del rango de sensibilidad (≤ 1 µg/ml). Contrariamente, los valores de CIM90 de las tres FQs son superiores para *E. coli* y ECP ubicándose dentro del rango de resistencia (≥ 4 µg/ml). Esta elevada

proporción de aislamientos resistentes o con sensibilidad intermedia (2 µg/ml) en las muestras de *E. coli* y de ECP se observa especialmente en los animales con antecedentes de tratamiento previo con otras FQs (12/23 y 4/10, respectivamente), lo que podría ser indicativo de una selección de microorganismos resistentes durante los mismos. La emergencia de cepas resistentes es, comúnmente, consecuencia de fallas en el tratamiento (incorrecta dosificación o posología, o incumplimiento de las indicaciones por parte del propietario del animal).

La mayor sensibilidad de los ECN se observó en los animales sin antecedentes de tratamiento antibiótico previo. Es importante remarcar que la mayoría de estos pacientes padecían abscesos, una patología que suele resolverse con una intervención localizada y sin la utilización sistémica de antimicrobianos.

Si se estiman los indicadores de eficacia terapéutica para FQs (Cmax/CIM y ABC/CIM) utilizando los resultados de CIM obtenidos en el presente trabajo y datos farmacocinéticos bibliográficos¹⁻³, se puede concluir que las tres FQs estudiadas serán eficaces para el tratamiento de

las bacterias aisladas sólo cuando la CIM es $\leq 0,031$ µg/ml. Con valores de CIM $\geq 0,125$ µg/ml (CIP y MBX para los aislamientos menos sensibles de estafilococos) se puede anticipar el fracaso terapéutico.

Para optimizar los indicadores de eficacia cuando van a utilizarse FQs, Boothe y col.⁶ postulan la necesidad de emplear las dosis terapéuticas más elevadas y administrarlas dos veces por día. Las manifestaciones de toxicidad ocular en gatos relacionadas con dosis altas de enrofloxacina y otras FQs⁹⁻¹⁰ se contraponen con esta opción por lo que se debería estimar el riesgo costo/beneficio en cada caso clínico. Una alternativa eficaz sería utilizar las FQs en las dosis y frecuencia seguras en combinación con otros antimicrobianos con actividad sobre el agente etiológico, lo que potenciaría la acción antibacteriana. Los resultados obtenidos para *E. coli* y estafilococos de origen felino, son coincidentes con los reportados en estudios previos^{6,12} y alertan sobre la necesidad de un uso más prudente de las FQs en la clínica de animales pequeños.

Es fundamental que se respete la dosis y esquemas posológicos correc-

tos y que se implementen pruebas de susceptibilidad (antibiograma) previas a la indicación y durante el tratamiento (con controles de acuerdo a la duración del mismo). Esto conducirá a disminuir la emergencia de cepas resistentes, preservando la eficacia de este grupo de antimicrobianos que son en la actualidad una de las herramientas más importantes en el tratamiento de infecciones en pequeños animales.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con fondos provenientes de los proyectos UBACyT V006 2004-2007 y UBACyT V002 2008-2010.

Bibliografía

1. **Albarellos GA, Kreil VE, Landoni MF.** Pharmacokinetics of ciprofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *J vet Pharmacol Therap* 2004; 27: 155-162.
2. **Albarellos GA, Montoya L, Landoni MF.** Pharmacokinetics of marbofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *Vet J* 2005; 170: 222-229.
3. **Albarellos GA; Ambros LA; Landoni MF.** Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *J vet Pharmacol Therap* 2005; 28: 363-369.
4. **Albarellos GA; Landoni MF.** Current concepts on the use of antimicrobials in cats. *Vet J* 2009; 180: 304-316.
5. **Amsterdam D.** Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V, Editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 61-143.
6. **Boothe DM, Boeckh A, Simpson R B, Dubose K.** Comparison of pharmacodynamic and pharmacokinetic indices of efficacy for 5 fluoroquinolones toward pathogens of dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 1297-1306.
7. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition – CLSI document M31-A3 Vol. 28. No. 8. Replaces M31-A2. Vol.22 No. 6. Wayne, Pennsylvania, USA; 2008.
8. **Drago L, De Vecchi E, Mombelli B, Nicola L, Valli M, Gismondo MR.** Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 37-45.
9. **Ford MM, Dubielzig RR, Giuliano EA, Moore CP, Narfström KL.** Ocular and systemic manifestations after oral administration of a high dose of enrofloxacin in cats. *Am J Vet Res* 2007; 68: 190 -202.
10. **Gelatt KN, van der Woerd A, Ketring KL, Andrew SE, Brooks DE, Biros DJ, Denis HM, Cutler TJ.** Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. *Vet Ophthalmol* 2001; 4: 99 -106.
11. **Goldstein EJC, Citron DM, Hunt Gerardo S, Hudspeth M, Merriam V.** Comparative in vitro activities of DU-6859a, Levofloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, and Ciprofloxacin against 387 aerobic and anaerobic bite wound isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1193 - 1195.
12. **Gottlieb S, Wigney DI, Martin PA, Norris JM, Malik R, Govendir M.** Susceptibility of canine and feline *Escherichia coli* and canine *Staphylococcus intermedius* isolates to fluoroquinolones. *Aust Vet J* 2008; 86: 147 - 152.
13. **Holt JG, Krieg NR, Sneathm PHA, Staley JT, Williams ST.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, MD Williams and Williams, 1994.
14. **McKellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG.** Pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J vet Pharmacol Therap* 2004; 27: 503 -514.
15. **Meunier D, Acar JF, Martel JL, Kroemer S, Vallé M.** A seven-year survey of susceptibility to marbofloxacin of pathogenic strains isolated from pets. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 592 - 598.
16. **Pirro F, Edingloh M, Schemeer N.** Bactericidal and inhibitory activity of enrofloxacin and other fluoroquinolones in small animal pathogens. *Compend Contin Educ Practic Veterinar* 1999; 21 (12M): 19 -25.
17. **Thomas VM, Guillaudeau LD, Thomas ER, Boisramé B.** Update on the sensitivity of recent European canine and feline pathogens to marbofloxacin. *Vet Q* 1997; 19 (Suppl. 1); 52 - 53.
18. **Walker RD.** The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. *Aust Vet J* 2000; 8: 84 - 90.
19. **Walker RD, Dowling PM. Fluoroquinolones.** En: Guiguère S, Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4th ed. Iowa, Blackwell Publishing, 2006, p. 263 - 284.
20. **Watts JL, Salmon SA, Sanchez MS, Yancey RJ.** In vitro activity of premafloxacin, a new extended-spectrum fluoroquinolone, against pathogens of veterinary importance. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1190 - 1192.